Aus der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. N. Henning

Experimentelle Studien zur Transplantationsimmunität

Das Verhalten zirkulierender Antikörper und des Properdin bei Sensibilisierung mit homologen Gewebsantigenen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen-Nürnberg

Vorgelegt von

Ingeborg Halfar
Bamberg

D 29

1963

1964 № 15

Dekan: Professor Dr. med. A. Windorfer

Referent: Professor Dr. med. ~~E. Schreck.~~
N. Henning

Tag der mündlichen Prüfung: 1. März 1963

Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin 138, 81—91 (1964)

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. N. Henning)

Das Verhalten zirkulierender Antikörper und des Properdins bei Sensibilisierung mit homologen Gewebsantigenen

Von

F. Scheiffarth, H. Warnatz, W. Frenger, I. Halfar und K. D. Tympner

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. Oktober 1962)

Die Frage, ob zirkulierende Antikörper bei der Homotransplantationsreaktion auftreten und welche Bedeutung sie für deren Ablauf besitzen, ist in den letzten Jahren vielfach diskutiert worden[25]. Gorer[9a–e] hat auf Grund umfangreicher Versuche mit Tumorgeweben bei Mäusen einen wesentlichen Anteil an der Klärung dieses Fragenkomplexes. Ihm gelang es nachzuweisen, daß zirkulierende Antikörper der verschiedensten Art bereits frühzeitig im Verlaufe einer Sensibilisierung auftreten und daß cytotoxische Antikörper eine große Bedeutung für die Vernichtung homologer Tumortransplantate besitzen. Die Untersuchungen mit normalen Geweben haben demgegenüber keine eindeutigen Ergebnisse erbracht. Billingham u. Mitarb.[5] konnten nachweisen, daß in vitro mit Immunseren inkubierte Zellen im Gegensatz zu mit Normalseren behandelten Zellen keine Proliferationstendenzen zeigen. Stetson[22,23] hat auf die Bedeutung der Immunseren im Verlauf der white-graft-Reaktion hingewiesen und in jüngeren Versuchen auch den Nachweis von Cytotoxinen, die gegen normale homologe Gewebe gerichtet sind, erbracht.

Demgegenüber spielen nach Medawar[3,16b] die zirkulierenden Antikörper bei der Homotransplantationsreaktion keine Rolle. Gegen die Bedeutung der humoralen Antikörper führt er an, daß ein hoher Titer an zirkulierenden Antikörpern keineswegs den Zustand der Transplantationsimmunität bedeutet[17,18]. Sofern zirkulierende Antikörper überhaupt im Verlaufe einer Homotransplantationsreaktion nachweisbar werden, beobachtet man sogar häufig eine Verlängerung der Überlebenszeit überpflanzten Gewebes im Sinne des Enhancementphänomens[12a, b, 21a, b]. Ferner setzt die Transplantationsreaktion früher ein, als zirkulierende Antikörper nachweisbar werden[9e]. Während erstere nämlich nach 6 Tagen voll ausgeprägt ist, erreicht die Fähigkeit, zirkulierende Antikörper zu bilden, erst nach 2—3 Wochen ihren Höhepunkt. Schließlich führen Immunseren weder bei in vitro-Versuchen, noch bei Übertragung

auf einen anderen Organismus zu einer Transplantatschädigung[2,3,17,18]. In diesem Zusammenhang werden insbesondere auch die Versuche von Weaver, Algire u. Prehn[24] mit der Diffusionskammer als Beweis angeführt.

Zielsetzung unserer Arbeit war es, immunologische Phänomene, die unter der Applikation intakter homologer Zellen sowie verschieden präparierter homologer Organextrakte im Tierversuch auftreten, in ihrem zeitlichen Ablauf qualitativ und quantitativ zu erfassen. Zum Nachweis der Transplantationsimmunität wurde die Überlebenszeit überpflanzter Haut bei den sensibilisierten Kaninchen nach der von Medawar angegebenen Technik festgestellt. Weiterhin wurden den immunisierten Tieren in bestimmten Zeitabständen Seren entnommen. Papierelektrophoretisch wurde festgestellt, ob im Verlaufe der Sensibilisierung auffällige Verschiebungen der einzelnen Serumeiweißfraktionen zu beobachten sind. Zum Nachweis zirkulierender Antikörper wurden Präcipitations- und Agglutinationstechniken angewandt; ferner wurde der Properdingehalt der Seren fortlaufend bestimmt.

Untersuchungsmaterial und Methodik

I. Spendertiere. Als Spendertiere wurden in unseren Versuchen erwachsene gesunde männliche Albinokaninchen des Stammes „Weiße Wiener" verwendet. Ihr Gewicht betrug zwischen 2500 und 3000 g.

Gewinnung des antigenen Materials. Als antigenes Material wurden Mischpräparate aus Milz und Niere jedes einzelnen Spendertieres verwendet. Die Kaninchen wurden durch intravenöse Applikation von 30 mg/kg Nembutal in die Ohrvene narkotisiert, anschließend wurden unter sterilen Bedingungen durch einen linksseitigen Flankenschnitt die Milz und die linke Niere herausgenommen. Nach Blutstillung wurden die Bauchdecken schichtweise verschlossen. Die Spendertiere überstanden den Eingriff durchweg gut.

Die Bereitung des antigenen Materials erfolgte für jedes Spendertier getrennt, und zwar wurden Milz und Niere der einzelnen Tiere zusammen verarbeitet. Die Organe wurden nach Entbluten mit einer Schere zerkleinert und anschließend durch ein feinmaschiges rostfreies Stahlsieb unter sterilen Bedingungen getrieben. Die so gewonnene Mischsuspension von Milz- und Nierenzellen wurde einmal in Ca^{++}freier Thyrodelösung gewaschen. Die Zellzahl wurde in einer Zählkammer nach Thoma bestimmt. Diese Zellsuspension wurde zur Sensibilisierung der Tiere der Gruppe A verwendet.

Bei der weiteren Verarbeitung zur Herstellung von Zellextrakten wurde nach der von Lejeune-Ledant* angegebenen Methode[1,14] vorgegangen. Die Zellen wurden in hypotonischer Lösung mit Hilfe eines Ultra-Turrax-Gerätes (Fa. Janke & Kunkel, 24000/min) homogenisiert; die nicht homogenisierten Partikel wurden durch Zentrifugieren bei 7000 U/min 10 min bei 4°C abgetrennt. Der Rückstand wurde unter Zusatz von 10 ml physiologischer Kochsalzlösung weitere viermal dem gleichen Homogenisierungsprozeß mit anschließendem Zentrifugieren unterzogen. Das schließlich zurückbleibende Sediment wurde verworfen.

* Herrn Dr. G. Lejeune-Ledant, Universität Lüttich, sei für die freundliche Unterweisung in allen praktischen Fragen der Transplantationstechnik aufrichtiger Dank ausgesprochen.

Das Homogenat wurde mit Hilfe von 0,1 n Salzsäure auf p_H 5 eingestellt. Die vorher klare Flüssigkeit zeigte dabei eine grobflockige Präcipitation. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugieren (800 U/min, 15 min) bei 4°C abgetrennt und mit 25 ml Natriumcitrat-Kochsalzlösung (0,15 m NaCl, 0,01 m Natriumcitrat) einmal gewaschen. Schließlich wurde das Sediment nach nochmaligem Zentrifugieren in destilliertem Wasser gelöst. Mit diesem Milz-Nierenzell-Extrakt wurde die Gruppe B der Empfängertiere sensibilisiert.

Um eine Aufbewahrung dieses nur begrenzt haltbaren Extraktes über längere Zeit zu ermöglichen, wurde eine Gefriertrocknung vorgenommen. Der gewonnene feinflockige Trockenextrakt wurde in dichtschließenden Gefäßen bei —20°C in der Tiefkühltruhe aufbewahrt. Zur Standardisierung des Extraktes wurde eine Stickstoffbestimmung kjeldahlometrisch vorgenommen, die einen durchschnittlichen Stickstoffgehalt von 90 μg/mg Trockenextrakt ergab. Dieser gefriergetrocknete Extrakt wurde zur Immunisierung der Gruppe C der Empfängertiere verwendet.

Um einen Vergleich der zur Sensibilisierung verwendeten antigenen Präparationen, der Milz-Nierenzellsuspensionen, des Milz-Nierenzellextraktes sowie der gefriergetrockneten Substanz, zu ermöglichen, wurde die in der Zählkammer bestimmte Zellzahl mit der Menge der jeweiligen Extrakte verglichen. Dabei entsprachen 10^8 Zellen 1 ml des Milz-Nierenzellextraktes bzw. 12 mg des gefriergetrockneten Extraktes.

II. Empfängertiere. Als Empfängertiere wurden gesunde erwachsene männliche Kaninchen der Kreuzungsart Belgische Riesen/Kleinsilber von einem durchschnittlichen Gewicht von 2500—3000 g verwendet.

Sensibilisierungsschema. Jedes Empfängertier wurde mit dem antigenen Material eines einzelnen Spendertieres sensibilisiert, d. h. jedem Empfängertier wurde ein bestimmtes Spendertier zugeordnet. Diese Versuchsanordnung wurde deshalb gewählt, damit in Ermangelung von Inzuchttieren eine individuelle Sensibilisierung der Empfängertiere gewährleistet war.

Die Kaninchen wurden in drei Gruppen zu je 15 Tieren eingeteilt. Die Gruppe A erhielt eine Milz-Nierenzellsuspension in einer Dosierung von 10^8 Zellen intravenös injiziert. Bei Gruppe B gelangte jeweils 1 ml des Milz-Nierenzellextraktes intravenös zur Anwendung. Bei Gruppe C schließlich wurden 12 mg des gefriergetrockneten Extraktes intravenös verabreicht.

Am 6. Tage nach Sensibilisierungsbeginn wurde bei allen drei Gruppen in gleicher Weise eine Transplantation von Haut des Spendertieres auf das jeweilige Empfängertier durchgeführt. Durch diese Hauttransplantation, die u. a. der weiteren Sensibilisierung diente, sollte nachgeprüft werden, ob durch die vorangegangenen Zell- bzw. Extraktinjektionen eine Transplantationsimmunität induziert worden war. Am 13. Tag wurde eine Probe der Transplantate zur histologischen Untersuchung entnommen und danach wurde mit einer weiteren intravenösen Injektionsserie von gefriergetrocknetem Organextrakt des jeweiligen Spendertieres bei den drei Gruppen in gleicher Weise begonnen. Insgesamt wurden vier Einzeldosen zu je 4 mg Extrakt in zweitägigem Abstand intravenös appliziert.

Hauttransplantation. Hierbei wurden freie Transplantate nach der Methode von Medawar[4] verwendet. Es wurden je vier homologe Transplantate des entsprechenden Spenderkaninchens und je zwei autologe des Empfängerkaninchens überpflanzt. Am 6. Tag nach Transplantation wurde die übertragene Haut makroskopisch inspiziert und einer histologischen Untersuchung unterzogen. Dazu wurden aus den einzelnen Transplantaten kleine Proben, die alle Schichten des Transplantates und Transplantatbettes umfaßten, entnommen. Die Beurteilung erfolgte nach dem Zustand der Epidermis, dem Ausmaß der lymphocytären Infiltration im Corium und dem Umfang der Gefäßschädigung bzw. Hämorrhagie.

Serumuntersuchungen. Die erste Blutprobe wurde vor Beginn der Sensibilisierung entnommen. Sie diente als Ausgangswert. Die weiteren Blutentnahmen erfolgten in siebentägigen Abständen, und zwar die zweite Entnahme unmittelbar vor der Hauttransplantation, die dritte zur Zeit der Entnahme von Transplantatmaterial, die vierte und fünfte jeweils eine Woche später.

Das *Serumgesamteiweiß* wurde mittels der Biuretmethode nach Weichselbaum[20] bestimmt.

Die *papierelektrophoretische* Untersuchung erfolgte nach Grassmann u. Hannig[11].

Zur Bestimmung *präcipitierender Antikörper* wurde eine geometrische Verdünnungsreihe des gefriergetrockneten Antigens (Ausgangskonzentration 1 mg gefriergetrockneter Extrakt pro Milliliter) mit durchschnittlich zehn Stufen angelegt. Nach Zugabe des jeweiligen Immunserums wurden die Präcipitationsröhrchen 2 Std bei 37°C inkubiert und die Ergebnisse 10 Std später abgelesen.

Mit der *passiven Hämagglutinationsreaktion* nach Boyden sollte die Fähigkeit des jeweiligen Immunserums geprüft werden, tannierte Erythrocyten, die durch Adsorption des entsprechenden Antigens (5 mg des jeweiligen gefriergetrockneten Extraktes) an ihre Oberfläche vorbehandelt waren, zu agglutinieren. Bei Seren, die eine Agglutination in der Antigenverdünnungsreihe zeigten, wurde eine Titerbestimmung ausgeführt.

Die quantitative *Properdinbestimmung*[13,15] erfolgte durch Messung des Stickstoffgehaltes des an Inulin gebundenen Properdins. 2 ml Serum wurden mit der gleichen Menge einer 0,5%igen Inulinsuspension versetzt und 2 Std bei 17°C inkubiert. Der durch mehrmaliges Waschen gereinigte Inulin-Properdinkomplex wurde anschließend in einem Kjeldahlkolben verascht und der Stickstoffgehalt nach dem Conwayverfahren bestimmt.

Ergebnisse der serologischen Untersuchungen

Die Ausgangswerte der *Serumgesamteiweißbestimmungen* waren bei allen Empfängertieren gemäß den in der Literatur angegebenen[19] normal. Während der Sensibilisierung ergaben sich keine Veränderungen im Gesamteiweißgehalt (Abb. 1).

Die Ergebnisse der *papierelektrophoretischen Untersuchungen* sind in Abb. 1 zusammenfassend dargestellt. Die Ausgangswerte stimmen mit den in der Literatur angegebenen[19] überein. Die Serumeiweißfraktionen ließen im Verlauf der Sensibilisierung in den drei Gruppen ähnliche Veränderungen erkennen. Die Albumine zeigten bereits nach 7, ausgeprägter nach 14 Tagen einen deutlichen Abfall. Im weiteren Verlauf der Sensibilisierung war ein langsamer Anstieg der Albumine zu beobachten, ohne daß sie den Ausgangswert wieder erreichten. Bei den α_1-Globulinen kam es im Verlauf der 1. Woche zu einem deutlichen Anstieg, nach 14 Tagen bis 3 Wochen war eine weitgehende Normalisierung des prozentualen Anteils dieser Fraktion festzustellen. Die α_2- und β-Globuline zeigten im Verlauf der Sensibilisierung nur geringe Schwankungen, die allenfalls bei den β-Globulinen eine langsam ansteigende Tendenz erkennen ließen. Bei den γ-Globulinen kam es 2—3 Wochen nach Sensibilisierungsbeginn in allen drei Gruppen zu einem allmählichen, mäßig starken Anstieg. Statistisch ließ sich bei erheblicher Streuung der Einzelwerte nur in wenigen Fällen eine Signifikanz der Unterschiede nachweisen.

Bei den *Präcipitationsversuchen* wurden in allen drei Gruppen durchweg negative Befunde erhoben.

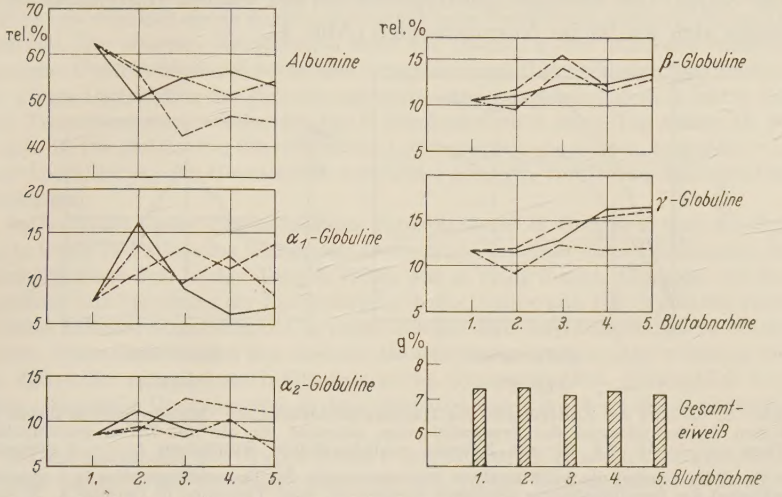

Abb. 1. Graphische Darstellung der Gesamteiweißwerte in Grammprozent und der papierelektrographisch ermittelten relativen Prozente der Serumeiweißfraktionen bei den Kaninchen der Gruppe A (—·—·—), der Gruppe B (———) und der Gruppe C (– – – –) während der Sensibilisierung, wobei auf der Abszisse die in wöchentlichem Abstand vorgenommenen Blutabnahmen aufgetragen sind

Bei der *passiven Hämagglutinationsreaktion* wurde in 13% der Versuchstiere vor Beginn der Behandlung eine Agglutination von geringer Titerhöhe (maximal 1:8) festgestellt. Eine Woche nach Sensibilisierungsbeginn zeigten 70—80% der Versuchstiere positive Agglutinationsreaktionen. Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sind der Abb. 2 zu entnehmen. Auffällig war, daß bei Gruppe A die Zahl der positiven Reaktionen am geringsten war. In Kontrollversuchen unter Verwendung von Milz-Nierenextrakten von anderen als den jeweils entsprechenden Spendertieren kam es bei antikörperhaltigen Seren in ca. 40% zu Kreuzreaktionen. Die Mittelwerte der Titer im Verlaufe der Sensibilisierung sind in Abb. 3 wiedergegeben. Die Titer überschritten Werte von 1:128 nicht.

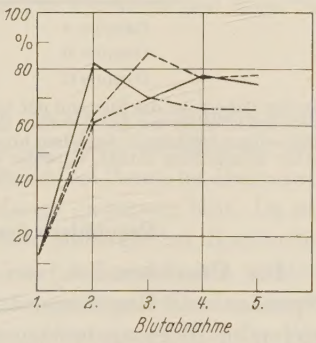

Abb. 2. Es wird der prozentuale Anteil der Tiere, deren Seren im Laufe der Sensibilisierung eine positive Agglutination ergaben, getrennt nach Gruppe A (–·–·–), Gruppe B (———) und Gruppe C (– – – –) wiedergegeben, wobei auf der Abszisse die in siebentägigem Abstand vorgenommenen Blutentnahmen dargestellt sind

Bei den *Properdinbestimmungen* fand sich 7 Tage nach Beginn der Sensibilisierung eine nur geringfügige Erhöhung des Properdinwertes im Serum gegenüber den Ausgangswerten. Demgegenüber zeigten die

14 Tage nach Versuchsbeginn, d. h. 7 Tage nach Transplantation erhaltenen Properdinwerte in ihrem Mittel eine Erhöhung auf das Doppelte der Norm. Der Serumproperdingehalt bei der vierten Blutentnahme bewegte sich wieder im Normalbereich (Abb. 4).

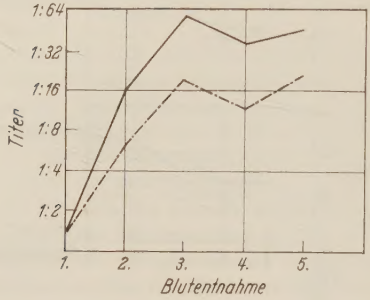

Abb. 3

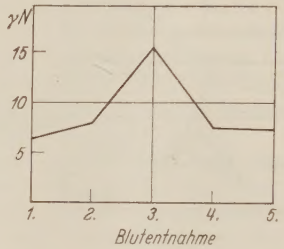

Abb. 4

Abb. 3. Es sind die Änderungen des Hämagglutinationstiter (Mittelwerte) in ihrem zeitlichen Ablauf während der Sensibilisierung, getrennt für die mit Zellen sensibilisierten Tiere (—·—·—) und die mit Extrakt vorbehandelten Kaninchen (———) dargestellt

Abb. 4. Es wurden die quantitativen Veränderungen des Properdingehaltes in γ Stickstoff während der Sensibilisierung graphisch dargestellt. Eine Trennung in Gruppe A, B, und C wurde nicht vorgenommen, da sich keine größeren Unterschiede ergaben. Die Blutentnahmen erfolgten in siebentägigem Abstand

	Transplantate		
	intakt	teilweise zerstört	zerstört
Gruppe A	4	6	4
Gruppe B	3	1	11
Gruppe C	2	2	10

In der Tabelle ist der Zustand der homologen Hauttransplantate 7 Tage nach Überpflanzung vom Spendertier auf das jeweilige Empfängertier bei Gruppe A, B und C wiedergegeben. Die Einteilung erfolgte, je nachdem ob die Transplantate bei makroskopischer und mikroskopischer Beurteilung intakt, teilweise zerstört (zerstörte neben intakten Transplantatarealen) oder völlig zerstört waren

Ergebnisse der Transplantatuntersuchungen

Die Überlebenszeit von homologen Transplantaten zwischen dem Spender- und Empfängerstamm war in Vorversuchen an vier Versuchstieren zu 10 Tagen bestimmt worden. Während im Vergleich zu diesem Normalwert die homologen Hauttransplantate bei der Gruppe A eine gering verlängerte Überlebenszeit (12—13 Tage) zeigten, ging die überpflanzte homologe Haut bei den Gruppen B und C beschleunigt nach durchschnittlich 6—9 Tagen zugrunde.

Bei der *makroskopischen Beurteilung* am 6. Tag nach Hautüberpflanzung zeigten die Transplantate bei den Tieren der Gruppe A eine Verdickung und eine Abschilferung der obersten Epithellagen mit Verlust der Haare. Hämorrhagien oder Zeichen einer Transplantatdestruktion waren zu diesem Zeitpunkt nicht nachweisbar. Die weitere Beobachtung des Transplantates nach Entnahme des histologischen Materials ließ am 9. Tag deutliche Hämorrhagien erkennen, und im Verlaufe weiterer 3 bis 4 Tage kam es zu einem völligen Zugrundegehen der transplantierten Haut.

Bei den mit Extrakt vorbehandelten Tieren zeigten die der Gruppe B stärkere Veränderungen als die der Gruppe C. Am 6. Tag nach Transplantation, also am Tag der Entnahme des histologischen Materials waren die überpflanzten Hautstückchen größtenteils verdickt, einige zeigten eine cyanotische Verfärbung, andere mehr opakes Aussehen. Die obersten Epithellagen samt den Haaren waren durchweg verlorengegangen. Übereinstimmend bei beiden Gruppen waren Hämorrhagien festzustellen. Die völlige Destruktion der Hauttransplantate erfolgte zwischen dem 6. und 9. Tag nach Transplantation, bei der Gruppe C durchschnittlich einen Tag später als bei Gruppe B. Die gleichzeitig überpflanzten Autotransplantate zeigten, abgesehen von einer Abschilferung der Hornschicht sowie einer geringen Verdickung keinerlei Veränderungen.

Bei *mikroskopischer Beurteilung* der Transplantate* in Gruppe A wies das Epithel in 3 von 14 Fällen eine beginnende Destruktion im Sinne einer Dissoziation der Basalzellschicht auf. In den übrigen Fällen war es völlig intakt. Allgemein fiel eine Acanthose mit Sprossung der Epithelzapfen in das Corium auf. Die Capillaren waren in vielen Fällen weitgestellt, und es zeigte sich das Bild der Leukodiapedese. In den meisten Präparaten fanden sich kleinere Hämorrhagien. Immer aber waren zu diesem Zeitpunkt ausgedehnte Infiltrationen von Lymphoidzellen, gelegentlich auch einige eosinophile Granulocyten, in dem ödematös durchtränkten Corium nachweisbar.

Bei den Kaninchen der Gruppe B und C zeigten sich die gleichen Veränderungen. In mehr als 50% der Präparate fand sich eine völlige Degeneration der Epithelzellen; in den restlichen Fällen konnten eine ausgeprägte Vacuolisierung des Cytoplasmas und Kernpyknose der Basalzellen nachgewiesen werden. Das Corium war von ausgedehnten Hämorrhagien und Anhäufungen mononucleärer Zellen durchsetzt.

Die Autotransplantate zeigten ein intaktes, teils proliferierendes Epithel. Im Corium wurden vereinzelt Lymphoidzellen gesehen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengestellt.

Diskussion

Die Versuche, deren Ziel der serologische Nachweis immunologischer Phänomene war, wurden an Kaninchen durchgeführt, da diese als gute Antikörperbildner den Vorzug besitzen, daß sich bei ihnen im Gegensatz zu kleineren Tieren Serum in genügender Menge gewinnen läßt. Da auf der anderen Seite aber genetisch identisches Material bei Kaninchen nicht zur Verfügung steht, muß der Nachteil in Kauf genommen werden, daß bei den Untersuchungen eine größere Schwankungsbreite der Ergebnisse auftritt. In Ermangelung von Inzuchtstämmen wurde die Versuchsanordnung so getroffen, daß ein Empfängertier jeweils antigenes Material, d. h. Zellen bzw. Zellextrakte nur von *einem* Spender erhielt. Auf diese Weise sollte eine individualspezifische Sensibilisierung erreicht werden, die durch Hauttransplantation vom gleichen Spenderindividuum nachgewiesen wurde. Kreuzreaktionen waren bei der genetischen Verwandtschaft der Spendertiere zu erwarten.

Bei der Sensibilisierung der Tiere wurden drei verschieden verarbeitete homologe Antigene verwendet, um die Bedeutung der Präparation des

* Herrn Prof. Dr. K. Elster vom Pathologischen Institut der Universität Erlangen sei für die Beurteilung der histologischen Präparate herzlich gedankt.

Antigens für die Bildung zirkulierender Antikörper und die Entwicklung der Transplantationsimmunität studieren zu können. Es ist bekannt, daß die intravenöse Applikation von homologem Zellmaterial (Gruppe A) bei Kaninchen keine Transplantationsimmunität hervorruft[16b]. Das konnte auch in unseren Versuchen bestätigt werden. Hauttransplantate von in dieser Weise vorbehandelten Tieren verhielten sich wie Ersttransplantate. Die Ursache dieses eigentümlichen Phänomens, das nur bei Kaninchen beobachtet wird, ist nicht bekannt.

Über die Wirksamkeit des nach Lejeune bereiteten Milz-Nierenzellextraktes liegen bereits ausführliche Angaben vor[1,14]. Auch in unseren Versuchen (Gruppe B) zeigten die Transplantate ein beschleunigtes Zugrundegehen im Sinne der Zweittransplantationsreaktion. Dieser Befund ist um so bemerkenswerter, als die Applikation des Extraktes auf dem gleichen Wege wie die der Zellen, d. h. intravenös erfolgte.

Die Versuche mit gefriergetrockneten Extrakten führten ebenfalls zu einer beschleunigten Abstoßung der Transplantate im Sinne der Zweittransplantatreaktion (Gruppe C). Die Transplantatüberlebenszeit war allerdings gegenüber den Versuchen bei Gruppe B gering, durchschnittlich 1—2 Tage verlängert. Damit konnten aber die Beobachtungen anderer Autoren[16a,b] nicht bestätigt werden, daß gefriergetrocknete Gewebsextrakte keine Transplantationsimmunität hervorrufen können, sondern daß sie eher ein „enhancement", d. h. eine Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit bewirken, während ihre Fähigkeit, humorale Antikörper zu bilden, auch nach Ansicht dieser Autoren voll erhalten ist.

Die Verschiebungen der elektrophoretisch erfaßten Serumeiweißfraktionen sind, soweit sie den initialen Abfall der Albumine und den Anstieg der α_1-Globuline betreffen, als Ausdruck einer unspezifischen Entzündungsreaktion zu werten. Der Anstieg der β-γ-Globuline, d. h. der Trägerfraktion der Immunglobuline, war bei den Tieren der Gruppe B und C nur gering und fehlte bei den Tieren der Gruppe A.

Die Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen stimmten mit den bereits von anderer Seite mitgeteilten Erfahrungen überein[9a–e,18]. Präcipitationsphänomene konnten weder bei den mit Zellen, noch bei den mit Extrakten sensibilisierten Tieren beobachtet werden und waren selbst bei Seren, die einen relativ hohen Agglutinationstiter aufwiesen, nicht nachweisbar. Die mit der passiven Hämagglutinationstechnik gewonnenen Resultate zeigen, daß auch eine Sensibilisierung mit normalen homologen Geweben oder Gewebsextrakten zirkulierende Antikörper entstehen läßt. Auffällig war, daß bei den meisten Versuchstieren zu einem sehr frühen Zeitpunkt, häufig bereits eine Woche nach Sensibilisierungsbeginn die Agglutinationsreaktion positiv ausfiel. Diese Beobachtungen sind in Übereinstimmung mit den Mitteilungen von Gorer[9b], dem bei Sensibilisierung mit Tumorzellen der Nachweis von zirkulierenden Antikör-

pern mit Hilfe der Dextranmethode[10] bereits 3—4 Tage nach Sensibilisierungsbeginn gelang. In unseren Untersuchungen fand sich ein geringer Unterschied zwischen den mit Zellen und den mit Gewebsextrakten sensibilisierten Tieren. Im letzteren Falle waren positive Reaktionen häufiger, und die gemessenen Titer lagen höher. Diese Tatsache ist interessant, weil Zellen bei intravenöser Applikation ja auch keine Transplantationsimmunität entstehen lassen.

Properdinbestimmungen im Serum wurden durchgeführt, um unspezifische Immunisierungsreaktionen im Zusammenhang mit der Transplantationsimmunität zu studieren. Wie unsere Untersuchungsergebnisse erkennen lassen, stieg das Serumproperdin im Mittel nach Transplantation rasch an und erreichte um den 14. Tag einen Gipfelpunkt, während später wieder annähernd normale Werte auftraten. Dieser Befund spricht für die Annahme, daß Properdin an Immunisierungsprozessen beteiligt ist und durch seine Affinität zu Zellpolysacchariden möglicherweise eine cytolytische Funktion besitzt.

Insgesamt kann auf Grund der mitgeteilten Ergebnisse festgestellt werden, daß im Verlaufe einer Sensibilisierung mit homologen Gewebsantigen spezifische humorale Antikörper erfaßt werden können, die in ihrem zeitlichen Auftreten etwa mit der Transplantationsimmunität übereinstimmen. Über die Bedeutung und Wirksamkeit dieser zirkulierenden Antikörper kann jedoch auf Grund der vorliegenden Arbeit keine Aussage gemacht werden. Möglicherweise handelt es sich um serologische Begleitphänomene ohne pathogenetische Bedeutung.

Zusammenfassung

Es wurde die Entwicklung serologischer Phänomene verfolgt, die bei Sensibilisierung von Kaninchen mit verschieden präparierten Gewebsantigenen auftreten. Die papierelektrophoretisch ermittelten Serumeiweißfraktionen zeigten zunächst einen Anstieg der α_1-Globuline und später ein langsames Ansteigen der γ-Globuline. Bei den immunologischen Untersuchungen führten Präcipitationsversuche zu negativen Ergebnissen. Mit der passiven Hämagglutinationstechnik nach Boyden konnten dagegen spezifische Antikörper von geringer Titerhöhe nachgewiesen werden. Verlaufsbestimmungen des Properdingehaltes zeigten einen deutlichen Anstieg 14 Tage nach Sensibilisierungsbeginn bzw. 7 Tage nach Transplantation homologer Haut. Eine Transplantationsimmunität blieb bei Applikation lebender Zellen aus, konnte jedoch nach intravenöser Injektion von Gewebsextrakten, die nach dem Verfahren von Lejeune-Ledant gewonnen bzw. gefriergetrocknet waren, beobachtet werden.

Summary

Investigations on the development of serological phenomenons in rabbits during sensitisation with differently prepared tissue antigens were performed. The paper electrophoretic analyses of serum protein fractions showed an increase of the α_1-globulins in the first two weeks and later on, a slow increase of the γ-globulins. All experiments to detect precipitating antibodies gave negative results. On the contrary with the hemagglutination technique of Boyden specific antibodies could be demonstrated, but only of a low titer. The properdin content rose significantly 14 days after the beginning of sensitisation or 7 days after the transplantation of homologous skin, respectively.

A transplantation immunity could not be obtained by intravenous application of homologous cells, but could be observed after intravenous injection of tissue extracts prepared by the technique described by Lejeune-Ledant and following lyophilisation.

Literatur

[1] Albert, F., et G. Lejeune-Ledant: Un antigène de transplantation préparé a partir de cellules épidermiques. Bull. Acad. roy. Méd. Belg. **24**, 746 (1959).

[2] Billingham, R. E., and L. Brent: Further attempts to transfer transplantation immunity by means of serum. Brit. J. exp. Path. **37**, 566 (1956).

[3] — — and P. B. Medawar: Quantitative studies on tissue transplantation immunity II. The origin, strength and duration of actively and adoptively acquired immunity. Proc. Roy. Soc. Med. **143**, 58 (1954).

[4] — and P. B. Medawar: The technique of free skin grafting in mammals. Brit. J. exp. Biol. **28**, 385 (1951).

[5] — and E. M. Sparrow: Studies in the nature of immunity to homologous grafted skin with special reference to the use of pure epidermal grafts. Brit. J. exp. Biol. **31**, 16 (1954).

[6] Boyden, S. V.: The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. J. exp. Med. **93**, 107 (1951).

[7] Fischer, H., W. Fritzsche u. H. Argenton: Die Bedeutung des Properdinsystems für den normalen und den gesteigerten Blutzellabbau. Klin. Wschr. **36**, 411 (1958).

[8] Frenger, W., F. Scheiffarth, H. Götz u. G. Berg: Diagnostische Verfahren der Immunologie, in N. Henning, Klinische Laboratoriumsdiagnostik, p. 203. München-Berlin: Urban & Schwarzenberg 1960.

[9a] Gorer, P. A.: The role of antibodies in immunity to transplanted leukemia in mice. J. Path. Bact. **54**, 51 (1942).

[9b] — Antibody response to tumor inoculation in mice. Cancer Res. **7**, 634 (1947).

[9c] — Antibody response to skin homografts in mice. Ann. N. Y. Acad. Sci. **59**, 365 (1955).

[9d] — Some reactions of H 2-antibodies in vitro and in vivo. Ann. N. Y. Acad. Sci. **73**, 707 (1958).

[9e] — Interactions between sessile and humoral antibodies in homograft reaction, in Cellular Aspects of Immuntiy, A Ciba Foundation Symposion, p. 330. London: Churchill 1960.

[10] Gorer, P. A., and Z. B. Mikulska: The antibody response to tumor inoculation; improved methods of antibody detection. Cancer Res. **14**, 651 (1954).
[11] Grassmann, W., H. Hannig u. M. Knedel: Über ein Verfahren zur elektrophoretischen Bestimmung der Serumproteine auf Filtrierpapier. Dtsch. med. Wschr. **76**, 333 (1951).
[12a] Kaliss, N.: Induced alteration of the normal host-graft relationships in homotransplantation of mouse tumors. Ann. N. Y. Acad. Sci. **59**, 385 (1955).
[12b] — Immunological enhancement of tumor homografts in mice. Cancer Res. **18**, 992 (1958).
[13] Kögler, W., F. Scheiffarth u. W. Frenger: Studien zur quantitativen Serumproperdinbestimmung. Acta haemat. (Basel) **25**, 49 (1961).
[14] Lejeune-Ledant, G.: Cellules vivantes, extraits cellulaires et phénomènes d'immunité de transplantation. Bull. Acad. roy. Méd. Belg. **25**, 394 (1960).
[15] McNall, E. G.: Assay of properdin in biological fluids. Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. **96**, 399 (1957).
[16a] Medawar, P. B.: Isoantigens, in Biological Problems of Grafting, in Les Congrès et Colloques de l'Université de Liège, p. 6. Oxford: Blackwell 1959.
[16b] — Reactions to homologous tissue antigens in relation to hypersensitivity, in Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states, p. 504. New York: Hoeber-Harper 1959.
[17] Mitchison, N. A.: Passive transfer of transplantation immunity. Proc. Roy. Soc. (Lond.) **142**, 72 (1954).
[18] — and O. L. Dube: Studies on the immunological response to foreign tumor transplants in the mouse. II. The relation between hemagglutinating antibody and graft resistance in the normal mouse and mice pretreated with tissue. J. exp. Med. **102**, 179 (1955).
[19] Scheiffarth, F., u. G. Berg: Serumeiweißbestimmungen bei Ratten und Kaninchen mit der Papierelektrophorese. I. Die Normalwerte bei Ratten und Kaninchen. Z. ges. exp. Med. **119**, 550 (1952).
[20] — — H. Schön u. H. Götz: Bluteiweiß, in N. Henning, Klinische Laboratoriumsdiagnostik, p. 10. München-Berlin: Urban & Schwarzenberg.
[21a] Snell, G. D.: The enhancing effect (or actively acquired tolerance) and the histocompatibility-2-locus in the mouse. J. nat. Cancer Inst. **15**, 665 (1954).
[21b] — Incompatibility reactions to tumor homografts with particular reference to the role of the tumor. Cancer Res. **17**, 2 (1957).
[22] Stetson, C. A., and R. Demopoulos: Reactions of skin homografts with specific immune serum. Ann. N. Y. Acad. Sci. **73**, 687 (1958).
[23] — and E. Jenson: Humoral Aspects of the immune response to homografts. Ann. N. Y. Acad. Sci. **87**, 249 (1960).
[24] Weaver, J. M., G. H. Algire and R. T. Prehn: The growth of cells in vivo in diffusion chambers II. The role of cells in the destruction of homografts in mice. J. nat. Cancer Inst. **15**, 1737 (1955).
[25] Wissler, R. W., and M. H. Flax: Cytotoxic effects of antitumor serum. Ann. N. Y. Acad. Sci. **69**, 773 (1957).

Professor Dr. F. Scheiffarth, 852 Erlangen, Krankenhausstraße 12, Medizinische Universitätsklinik

Druck von J. P. Peter, Gebr. Holstein, Rothenburg o. d. Tbr.

Lebenslauf

Am 30. September 1937 wurde ich als 2. Tochter des Rektors Dr. Karl Halfar und seiner Ehefrau Margarete, geb. Otto, in Neuß a/Rhein geboren. Auf Grund einer Versetzung meines Vaters verzogen wir nach Prag, wo ich vom September 1943 bis Herbst 1944 die erste Klasse einer deutschen Volksschule besuchte. Fliegerangriffe, ein 6-monatiger Aufenthalt in einem tschechischen Konzentrationslager 1945 und der anschließende häufige Wechsel in verschiedene Kinderheime machten einen weiteren Schulbesuch unmöglich.

Erst im April 1947 besuchte ich für drei Monate eine einklassige Landvolksschule im Fichtelgebirge und bestand im Herbst desselben Jahres die Aufnahmeprüfung für die Oberrealschule in Wunsiedel.

Ab April 1949 besuchte ich dann die Oberrealschule für Mädchen in Nürnberg und legte hier 1956 das Abitur des realgymnasialen Zweiges mit Erfolg ab.

Nach einem halbjährigen Praktikum am Caritaskrankenhaus in Bad Mergentheim begann ich im Sommersemester 1957 an der Friedrich-Alexander-Universität zu Erlangen das Medizinstudium, und legte hier im Sommersemester 1959 die ärztliche Vorprüfung ab. Das medizinische Staatsexamen bestand ich in Erlangen am 28. Februar 1963.